

Title	Molecular physiological characterization of TRP channels as mediators of cellular redox status( Abstract_要旨 )
Author(s)	Heba, Abdallah Elsaid Badr
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2016-11-24
URL	<a href="https://doi.org/10.14989/doctor.k20064">https://doi.org/10.14989/doctor.k20064</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（工学）	氏名	Heba Abdallah Elsaid Badr
論文題目	Molecular physiological characterization of TRP channels as mediators of cellular redox status (細胞のレドックス状態の仲介因子としての TRP チャンネルの分子生理学的特性)		
(論文内容の要旨)			
<p>細胞は環境変化を生き抜くために、細胞内外の化学的・物理的变化を敏感に感知し、適応しなければならない。環境変化の感知は多くの場合、細胞内外の境界である細胞膜に局在する膜タンパク質によって行われている。センサーとして働く重要な膜タンパク質の一つに、Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>等の陽イオン流入を仲介する非選択的陽イオンチャネルである Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルが挙げられる。最近の研究により、細胞内外の酸化・還元物質(レドックス分子)は、炎症・発達・細胞分化・神経変性疾患等において、シグナル分子として重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。TRP チャンネルはレドックス分子を感知し活性化するが、それらが担う Ca<sup>2+</sup>シグナリングの生理学的意義は未解明な点も多い。本論文は、近年、酸化感受性を有することが報告された TRP チャンネルの M, C, V, A サブファミリーに注目し、レドックス分子に対する応答を解析することで、新たな Ca<sup>2+</sup>シグナリングの分子機構並びに生理学的意義を見出した結果をまとめており、3 章からなっている。</p> <p>序論では、酸化力を有する活性分子種のシグナル伝達物質としての生理学的な重要性ならびに、TRP チャンネルの酸化感受性に関する先行研究の現状、本研究の意義等がまとめられている。</p> <p>第 1 章では、アセトアミノフェン(APAP)過剰投与に伴う酸化ストレスによる肝臓毒性や細胞死を仲介する分子実体が、レドックス感受性の TRP チャンネル(TRPV1, TRPC1, TRPM2, TRPM7)であることを見出した。APAP は、適切な服用量であれば安全な解熱鎮痛薬となるが、多量に服用すれば人間に致死的な肝毒性を与え得る可能性がある。しかし、APAP の多量服用によって肝細胞が致死状態に陥る際、レドックス分子が誘発する Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に関わるメカニズムは、現在も解明されていない。本章では、ヒト由来肝臓細胞(HepG2 細胞)に APAP を処置した場合、細胞内で活性酸素種が発生することを見出した。HepG2 細胞には TRP チャンネルのサブタイプである TRPV1, TRPC1, TRPM2, TRPM7 の発現を確認した。さらに、In situ hybridization 法により、TRPV1, TRPC1, TRPM2, TRPM7 の転写物が、人間の肝細胞組織における肝細胞及びクッパー細胞内に点在していることも示した。HepG2 細胞においては、TRPV1, TRPC1 を siRNA や阻害剤で阻害したところ、APAP に誘発された活性酸素の生成や Ca<sup>2+</sup>流入、細胞死が抑制された。この抑制効果は、TRPM2 や TRPM7 を阻害した場合の抑制効果より大きかった。興味深いことに、TRPV1 や TRPC1 は、システイン選択型修正修飾試薬に修飾されており、APAP の存在下ではこの修飾作用が減弱したことから、APAP もしくはその酸化代謝物が直接的に TRPV1 や TRPC1 に作用している可能性が考えられた。本成果は、APAP に誘発された Ca<sup>2+</sup>の流入、その後の肝細胞死がさまざまな酸化活性化チャネルによって引き起こされるという新しい分子機構を明らかにし、これらの TRP チャンネルが、APAP の過剰摂取を治療するための創薬ターゲットになる可能性を示唆する。</p> <p>第 2 章では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 感受性を有する TRPM2 に着目し、TRPM2 が炎症性疾患である関節リウマチの悪化に重要であることを明らかにした。関節リウマチは、関節軟骨基質</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	Heba Abdallah Elsaid Badr
<p>の主成分である II 型コラーゲンに対する自己抗体の産生に伴う自己免疫応答によって、関節局所での過剰な炎症を起こし、関節や骨に損傷をきたす疾患であり、炎症の悪化・慢性化の分子機序の解明は急務である。関節炎症部位では活性酸素種が産生されていると言われていることから、本章では、<i>Trpm2</i> 遺伝子欠損マウスにおいてコラーゲン抗体誘発性の四肢の腫れ、関節腔への炎症性細胞の浸潤、骨の損傷といった各種関節リウマチ症状を評価し、これらの症状が野生型マウスよりも大きく抑制されることを見出した。また、<i>Trpm2</i> 遺伝子欠損マウスでは、関節リウマチの増悪を促すサイトカインと呼ばれるタンパク質群の産生量が野生型マウスに比べて大きく減少していることも分かった。以上より、本章は、酸化感受性 TRPM2 は関節リウマチを悪化させる働きがあることを示し、関節リウマチの新規治療薬の標的としての TRPM2 の可能性を強く示唆している。</p> <p>第 3 章では、TRPV1 のレドックス感受性機構を明らかにしている。本章では TRPV1 は細胞内で安定したサブユニット間ジスルフィド結合 (Cys258-Cys742) を形成していることを明らかにした。質量分析法により TRPV1 が保持する複数のシステイン残基の酸化感受性を定量したところ、サブユニット間ジスルフィド結合に関与しているシステイン残基 (Cys258) は高い酸化感受性を有しており、酸化によるチャネル活性に重要であることが判明した。またサブユニット間ジスルフィド結合で繋がれた TRPV1 二量体上にある Cys258 と Cys742 の酸化状態を検討したところ、酸化型に加えて還元型の両方が双方で検出された。以上のことから、ホモ四量体である TRPV1 は、酸化還元状態がヘテロなジスルフィド結合に関与しているシステイン残基を保持するサブユニットと酸化感受性を持つフリーのシステイン残基を保持するサブユニットの双方から構成されていることが示唆された。</p> <p>以上、本論文は、酸化感受性 TRP チャネル等の機能について実験を行い、TRP チャネルファミリーの新しい薬理的・生理学的機能を明らかにしており、結論では、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、活性酸素種・窒素種が担う広範な生理・病態応答を、酸化感受性 TRP チャンネルが担う役割の解明を切り口に追究した成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. APAP 過剰投与に伴う酸化ストレスによる肝臓毒性や細胞死を仲介する分子実体が、レドックス感受性の TRP チャンネル、特に TRPV1, TRPC1, TRPM2, TRPM7 であることを見出した。ヒト由来肝臓ガン細胞に APAP を処置した場合、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が起こり、各チャンネルの選択的な阻害剤を処置した場合はその効果が消失したことから、APAP による肝細胞の損傷並びに細胞死が、これらレドックス感受性 TRP チャンネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入によって引き起こされるという、新たな分子機構が明らかとなった。
2. TRPM2 が炎症性疾患である関節リウマチの悪化に関わっていることを明らかにした。即ち、*Trpm2* 遺伝子を欠損させたマウスに関節リウマチモデルを適用したところ、関節での炎症や骨の破壊、炎症性タンパク質群の産生等の関節リウマチ症状が抑制された。
3. 質量分析法により TRPV1 が保持する複数のシステイン残基の酸化感受性を定量し、酸化ストレスによってシステイン残基が直接酸化されることを証明した。さらに TRPV1 は細胞内でサブユニット間のジスルフィド結合を形成しており、異なる酸化修飾を受けているサブユニットによって四量体を形成していることを明らかにした。

以上、本論文は、酸化感受性 TRP チャンネルファミリーの新規薬理学的・生理学的機能について述べたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年9月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。